

総 説

自己骨髄細胞を用いた肝臓再生療法－基礎的研究と臨床応用

坂井田功

山口大学医学部分子制御系・内科学第一講座 宇部市南小串1丁目1-1 (〒755-8505)

Key words : 骨髄細胞, 細胞移植, 幹細胞, 肝再生, 肝線維化

和文抄録

基礎的検討としてマウスに四塩化炭素を週に2回, 4週間投与すると, 重度の肝障害を誘発し, 急激に肝線維化が進行し肝硬変に進展した. これに同種同系のGreen Fluorescent Protein (GFP) マウスの骨髄細胞を尾静脈から投与し, その後も4週間四塩化炭素の投与を続けて, 肝障害を持続させたところ, 尾静脈より投与された骨髄細胞は, 硬変肝内に浸潤定着した. これら骨髄細胞は, 肝芽細胞を経てアルブミンを産生する肝細胞へと分化した. 四塩化炭素投与による炎症と言う微小環境が, 骨髄細胞から肝細胞への分化に本質的に重要なものと考えられた. 骨髄細胞移植によって肝硬変のマウスの肝機能は改善し, 肝線維化の減少と生存率の向上が見られた. これら, 基礎的研究を基に現在臨床研究を始めているが, ほぼ全例で肝機能改善と肝線維化マーカーの減少が見られている.

はじめに

わが国においては, 数百万人におよぶウイルス性慢性肝炎患者と, その線維化が進行した肝硬変患者が30万人程度いると推定されている. 肝硬変の中でも進行した非代償性肝硬変に対して, すでに生体肝移植がおこなわれているが, 大きな問題として脳死肝移植があまり普及しないことなどにより, ドナー不足や外科的侵襲など現状では克服すべき課題が多い. こうした肝硬変 (肝不全) に対し, 臓器移植の

代用としての細胞移植療法の可能性として, 現在試みている『自己骨髄細胞を用いた肝臓再生療法』の基礎的研究とその臨床応用について述べる.

1. 骨髄細胞の肝細胞への分化の可塑性

生体内で大きな臓器である肝臓は肝細胞, 星細胞, Kupffer細胞, Pit細胞, 内皮細胞より構成されており, 代謝・蛋白合成・解毒など多機能をつかさどっている. 2000年にTheiseらは, 骨髄細胞の肝細胞への分化の可塑性について, 男性ドナーから骨髄移植を受けた女性レシピエントの剖検例において, 骨髄細胞が肝細胞に分化することを報告した¹⁾. これは女性レシピエントの肝細胞内にY染色体陽性細胞の存在を証明し, 骨髄細胞の肝細胞への分化の可塑性を報告したものである. また骨髄細胞の腸管への分化についても報告され, 骨髄中には, さまざま臓器の細胞に分化する細胞が存在することが明らかになった²⁾.

2. 骨髄細胞における分化の可塑性

われわれは自己骨髄細胞を用いた肝臓再生療法の研究を推進するにあたり, どのような状態において骨髄細胞は肝細胞に分化するかという問題を解決したいと考えた. この骨髄細胞の分化に参与する微小環境“Niche”は, さまざまな炎症, 免疫的なシグナル, 転写因子, 細胞外マトリックスなどが関与し制御されていると考えられる. 血球幹細胞が肝細胞に分化しその結果, 肝臓の機能を代償したことについては, チロシン血漿突然変異マウス (FAH欠損マウス) に対し, β -ガラクトシダーゼ (β -galactosidase: β -gal) 陽性の血球幹細胞の投与に

平成18年1月11日受理

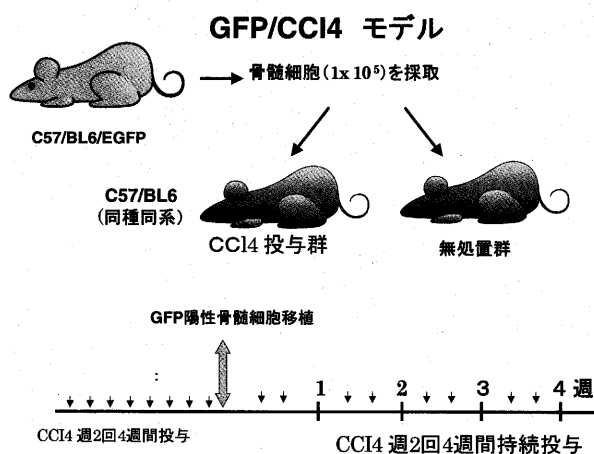


図1 基礎研究GFP/CCl4モデルのプロトコール

より、移植した β -gal陽性細胞が肝臓に細胞塊をつくり定着し、肝臓の機能がうまく代償されることが報告された³⁾。しかしこのモデルは非常に特殊なチロシン血症モデルであり、われわれが日常の現場で見る肝炎、肝硬変モデルと病態は異なる。一方でわれわれが実際に再生療法をおこない救命したいと考える対象患者は、ウイルス肝炎による持続肝障害がつづいている肝硬変患者（非代償性肝硬変症）が対象になる。このため、レシピエントモデルを四塩化炭素（CCl₄）の持続投与によりつくった肝硬変マウスとし、GFPTgマウス⁴⁾から採取したGFP陽性骨髄細胞を尾静脈から投与し肝細胞への分化の有無を評価した（GFP/CCl₄モデル）。すなわち、週2回のCCl₄投与を4週間行い、この持続肝障害により肝硬変状態にしたレシピエントマウスに、GFP陽性の骨髄細胞（非培養、ヘテロな細胞集団）を尾静脈より投与した（図1）。その後も、CCl₄投与をさらに4週間投与しGFP陽性骨髄細胞の肝への定着・分化について評価した。肝障害がない状態では、骨髄細胞は肝臓には浸潤定着しないが、CCl₄での持続肝障害状態で投与した骨髄細胞は投与後1日目から門脈周囲に定着し、持続肝障害下のNicheにおいて骨髄細胞から肝芽細胞に分化し、最終的には機能的な肝細胞索様構造をつくりアルブミン産生の肝細胞へ分化することが明らかになった⁵⁾。実際に血液中のアルブミン値も上昇し肝機能を改善していた。骨髄細胞はA6陽性Oval細胞の表現型はとらないことが明らかになり、GFP/CCl₄モデルにおいては投与した骨髄細胞がOval細胞の表現型を経ることはなく、発生段階と同様に肝芽細胞の表現型を経ながら

肝細胞に分化することが明らかになった⁶⁾。GFP/CCl₄モデルにおける骨髄細胞の分化転換に炎症性シグナルが重要なことは、骨髄細胞投与後にCCl₄を中止すると、ほとんど骨髄細胞が肝内に見られないことから判明した。また、骨髄細胞から肝細胞への分化を促進する因子としてFGF2が有効であることが判明した⁷⁾。

骨髄中に存在する細胞群には諸説あるが、大きく分けて将来血球系になる細胞群とそうでない間葉系の細胞群に分けて検討したところ、主に間葉系の骨髄細胞群が肝細胞に分化することが判明した⁶⁾。

3 肝線維化に対する効果

肝内に浸潤した骨髄細胞は過剰に産生沈着した線維に沿って存在する（図2）。さらに週を追うごとに、既存の線維の中に浸潤していく像が見られる。この過程で、細胞外マトリックスを溶解するMatrix metalloproteinases (MMPs)（特にMMP-9）の発現が増加することが判明し、MMP-9産生細胞が骨髄細胞であることは、MMP-9のmRNA、蛋白の発現がGFP陽性の細胞であることから証明され、さらにこのMMP-9が実際に蛋白分解酵素としての酵素活性をもつことを、in situ zymographyで証明できた（図3）⁸⁾。骨髄細胞を投与後もCCl₄を持続投与し、壊死炎症が持続したにもかかわらず骨髄細胞投与後4週目の肝線維化は、1週目よりも改善（減少）した。このような効果は、FGF2を骨髄細胞と同時投与することでさらに強まることを最近見出している。

慢性肝炎などで持続炎症があると、肝内の星（伊東）細胞が活性化されて、コラーゲンなどの細胞外マトリックスを産生し、活性化初期にMMPsの発現は認めるものの、時間が経つとこれを阻害するTIMPs (Tissue inhibitor of metalloproteinases)が発現し、線維は溶解せずに蓄積の方向に向う。インターフェロンでウイルスが完全排除されて壊死・炎症がなくなると、星細胞は不活性化されてコラーゲンやTIMPsの産生を停止し、相対的にMMPsの活性が高まり既存の線維は溶解する。今回の研究結果では、壊死・炎症が持続しているにもかかわらず、線維化が減少しているという日常のこれまでの臨床では不可能なことを可能にすることができた。すなわち、これまでの肝線維化をできるだけ抑制して、

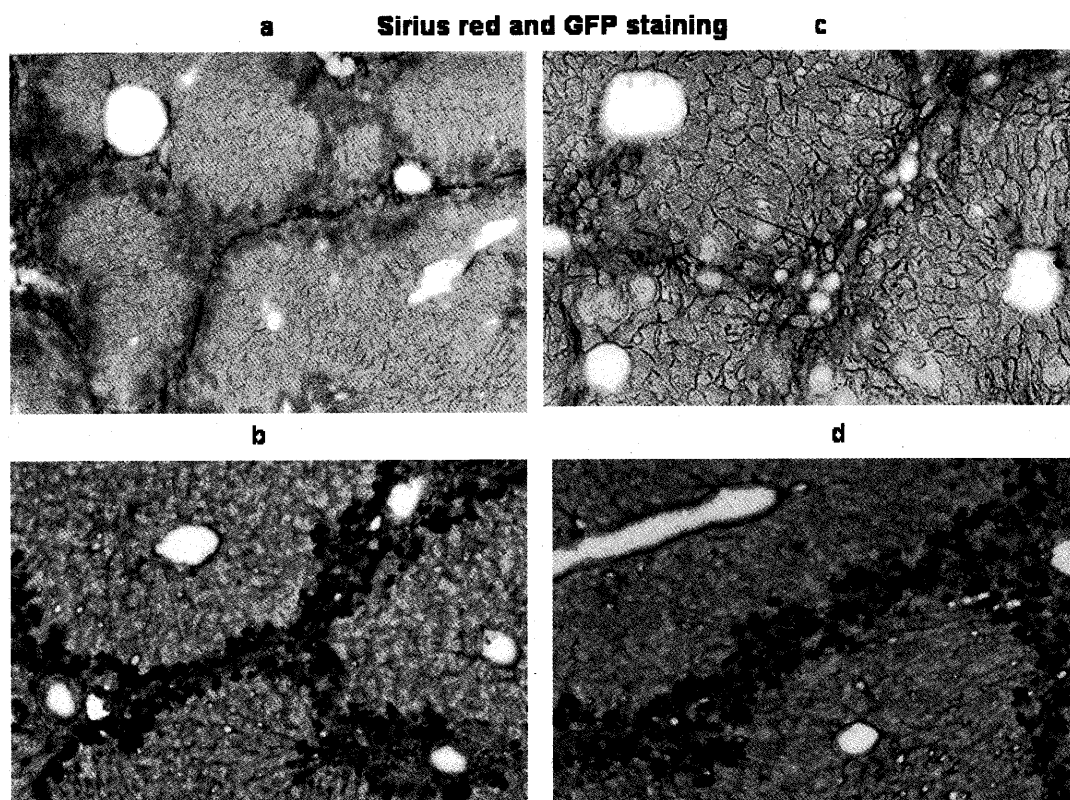


図2 GFP/sirius red染色
 a, b: 骨髓細胞投与2週後のマウス肝臓 c, d: 同3週後→線維化の中に浸潤した移植骨髓細胞 文献8より引用

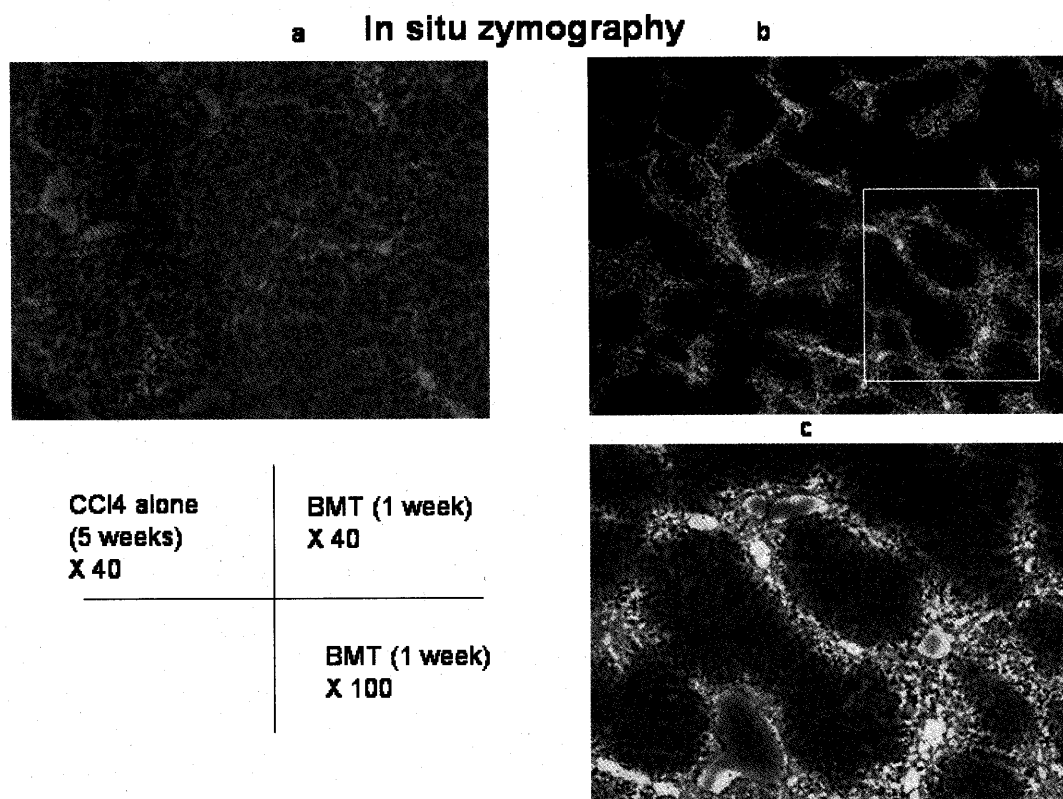


図3 in situ zymography
 a: CC14単独投与5週後のマウス肝臓 b: 骨髓細胞投与1週後のマウス肝臓 (弱拡大) c: bの強拡大 文献8より引用

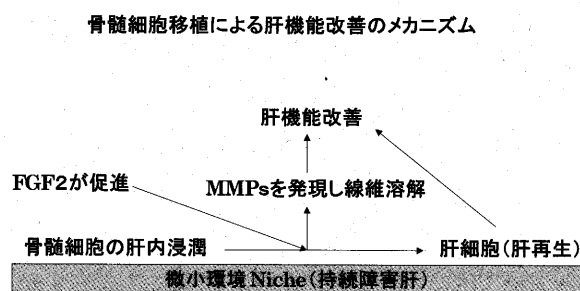


図4 骨髓細胞移植による肝機能改善のメカニズム

肝再生を促すといった受身的なものから、積極的に肝再生を引き起こしその過程で肝線維化も減少させることができると言う理想的な結果を得ることができた(図4)。この現象を起こす骨髓細胞も先述のごとく骨髓中の間葉系の細胞群であることを証明している⁸⁾。

4 臨床への応用

骨髓細胞移植を用いた下肢および血管再生療法はすでに臨床応用がおこなわれており^{9, 10)}、血液疾患の治療に骨髓移植は過去20年以上の経験があり、骨髓採取そのものについては確立されている。われわれの基礎的な検討では骨髓細胞の投与により肝機能の改善が確認され、また肝線維化・生存率も改善していた。これらの結果は肝不全(非代償性肝硬変症)などに対する『自己骨髓細胞を用いた肝臓再生療法』の臨床開発の可能性を強く示す結果であった。われわれは山口大学医学部付属病院の倫理委員会承認後の2003年11月14日より、(自己骨髓細胞を用いた肝臓再生療法)第I相臨床研究を開始し、その安全性を検証している。対象患者(非代償性肝硬変症)は、血清総ビリルビン値3 mg/dL以下、血小板は5万以上、肝細胞癌合併例については治療によりコントロール良好な症例であること、また食道・胃静脈瘤合併例においても破裂の危険性のない症例とした。さらに骨髓採取に伴い全身麻酔をかけるので心肺機能に問題の無い患者とした。現在までに、主にB型C型肝炎ウイルスによる非代償性肝硬変患者に自己骨髓細胞移植を行ない幸いにも大きな副作用を認めず、ほぼ全例で血清アルブミン値の上昇と肝線維化マーカーの改善、および予期せず血小板の増加と言ったよい効果を認めている。

今後の課題

持続肝障害下において投与した骨髓細胞が効率よく肝臓に遊走定着し、肝芽細胞になり肝細胞になることが明らかになったが、①障害肝に骨髓細胞を引き寄せるメカニズム②細胞移植の効果の持続期間③移植した骨髓細胞の肝内への浸潤・分化に伴う既存の肝構成細胞への影響(既存の肝細胞からのサイトカインの誘発など)について解明していかなければならない。現在までに11症例の臨床例を経験し、幸いにも問題となるような大きな副作用は認めておらず、安全に骨髓細胞移植が行なわれている。今後は慎重に症例を重ねphase I臨床研究を進めていき、他施設とも共同研究を進め、肝臓領域における新たな再生療法としての『自己骨髓細胞を用いた肝再生療法』の確立を目指したい。

謝 辞

本研究は、厚生労働省厚生科学研究費(基礎研究成果の臨床応用推進事業)の補助を得て推進されている。

文 献

- 1) Theise ND, Nimmakayalu M, Gardner R, Illei PB, Morgan G, Teperman L, Henegariu O, Krause DS. Liver from bone marrow in humans. *Hepatology* 2000; **32**: 11-16.
- 2) Okamoto R, Yajima T, Yamazaki M, Kanai T, Mukai M, Okamoto S, Ikeda Y, Hibi T, Inazawa J, Watanabe M. Damaged epithelia regenerated by bone marrow-derived cells in the human gastrointestinal tract. *Nat Med* 2003; **8**: 1011-1017.
- 3) Lagasse E, Connors H, Al-Dhalimy M, Reitsma M, Dohse M, Osborne L, Wang X, Finegold M, Weissman IL, Grompe M. Purified hematopoietic stem cells can differentiate into hepatocytes in vivo. *Nat Med* 2000; **6**: 1229-1234.
- 4) Okabe M, Ikawa M, Kominami K, Nakanishi T, Nishimune Y. 'Green mice' as a source of

- ubiquitous green cells. FEBS Lett 1997 ;
407 : 313-319.
- 5) Terai S, Sakaida I, Yamamoto N, Omori K, Watanabe T, Ohata S, Katada T, Miyamoto K, Shinoda K, Nishina H, Okita K. An in vivo model for monitoring trans-differentiation of bone marrow cells into functional hepatocytes. J Biochem (Tokyo) 2003 ; 134 : 551-558.
- 6) Yamamoto N, Terai S, Ohata S, Watanabe T, Omori K, Shinoda K, Miyamoto K, Katada T, Sakaida I, Nishina H, Okita K. A subpopulation of bone marrow cells depleted by a novel antibody, anti-Liv 8, is useful for cell therapy to repair damaged liver. Biochem Biophys Res Commun 2004 ; 313 : 1110-1118.
- 7) Ishikawa T, Terai S, Urata Y, Marumoto Y, Aoyama K, Sakaida I, Murata T, Nishina H, Shinoda K, Uchimura S, Hamamoto Y, Okita K. Fibroblast growth factor 2 facilitates the differentiation of transplanted bone marrow cells into hepatocytes. Cell Tissue Res 2005 ; 14 : 1-11.
- 8) Sakaida I, Terai S, Yamamoto N, Aoyama K, Ishikawa T, Nishina H, Okita K. Transplantation of bone marrow cells reduces CCl4-induced liver fibrosis in mice. Hepatology 2004 ; 40 : 1304-1311
- 9) Hamano K, Li TS, Kobayashi T, Hirata K, Yano M, Kohno M, Matsuzaki M. Therapeutic angiogenesis induced by local autologous bone marrow cell implantation. Ann Thorac Surg 2003 ; 73 : 1210-1215.
- 10) Stamm C, Westphal B, Kleine HD, Petzsch M, Kittner C, Klinge H, Schumichen C, Nienaber CA, Freund M, Steinhoff G. Autologous bone-marrow stem-cell transplantation for myocardial regeneration. Lancet 2003 ; 361 : 45-46.

Therapy for Liver Regeneration with Autologous Bone Marrow Cell Transplantation – Basic Research and Clinical Application

Isao SAKAIDA

*Department of Internal Medicine I and Molecular Science & Applied Medicine,
Yamaguchi University School of Medicine,
1-1-1 Minami Kogushi, Ube, Yamaguchi 755-8505, Japan*

SUMMARY

Treatment of mice with CCl₄ twice a week for 4 weeks developed liver cirrhosis with severe hepatic damage. Then mice were transplanted with bone marrow cells (BMCs) of Green Fluorescent Protein (GFP) mouse continuing treatment with CCl₄ for another 4 weeks. Transplanted GFP-positive BMCs migrated into the peri-portal lesions of the cirrhotic liver. The transplanted GFP-positive BMCs differentiated into hepatoblasts and then differentiated into albumin-producing hepatocytes. The differentiation "niche" induced by persistent liver damage due to continuous CCl₄ injection seems to be an essential factor. BMC transplantation improved liver function, liver fibrosis and the survival rate. These findings strongly support the development of a new cell therapy using autologous BMCs to treat liver cirrhosis patients. Based on the results obtained in basic research using the GFP/CCl₄ model, human trials for the patients with decompensate liver cirrhosis are now undergoing. Almost all cases showed improved liver function and reduced liver fibrosis marker after BMC transplantation without severe side effects.